

MAXMA 14 KIRAZ ANACININ IN VITRO ÜRETİMİ

Serra HEPAKSOY

Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü
35100 Bornova-İzmir/TURKEY

ÖZ: Bu çalışmada, *P. mahaleb* x *P. avium* melezi olan *M* x *M* klonlarından olan MaxMa 14 kiraz anacının doku kültürü ile çoğaltma olanakları araştırılmıştır. Sürgün uçları, farklı hormon tipi ve konsantrasyonu içeren 18 farklı MS (Murashige-Skoog) besin ortamında kültüre alınmıştır. Genel olarak çoğalma ve gelişme üzerine GA_3 düşük konsantrasyonda her hangi bir etkide bulunmamıştır. Ancak, konsantrasyonun $0,25 \text{ mg l}^{-1}$ olması çoğalmanın azalmasına neden olmuştur. Oksin olarak IBA veya NAA arasında önemli bir farklılık olmazken, bu hormonların konsantrasyonlarının $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ olması, $0,25$ veya $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ olmasına göre daha olumlu sonuç vermiştir. En yüksek köklenme $4 \mu\text{M}$ IBA / NAA içeren MS ortamında gerçekleşmiştir. Ayrıca, besin ortamlarına dikimden önce, in vitro sürgünlerin NAA çözeltisine batırılmaları köklenmeyi artırmıştır. Köklü in vitro bitkilerin dış ortama aktarılması sırasında kullanılabilecek en iyi ortam olarak torf ve harç bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: *M* x *M* Klonları, MaxMa 14, anaç, in vitro çoğaltma.

IN VITRO PROPAGATION OF MAXMA 14 SWEET CHERRY ROOTSTOCK

ABSTRACT: In this study, the possibilities of propagation of the one of the *M* x *M* clones cherry rootstocks MaxMa 14 by tissue culture was investigated. Shoot tips of MaxMa 14 were cultured on 18 different MS (Murashige-Skoog) medium containing different kinds of hormones and concentrations. In general, GA_3 remained quite ineffective in the development of newly formed shoots, but higher concentration (0.25 mg l^{-1}) was affected negatively. There was no significant difference between the two auxins IBA and NAA used, however concentrations of 0.1 mg l^{-1} gave better results than 0.25 or 0.5 mg l^{-1} . The highest rooting was obtained on MS medium with the $4 \mu\text{M}$ IBA or NAA. Rooting was improved by immersing in vitro shootlets to NAA solution prior to rooting medium. Peat and soil-sand-manure mixture were the most effective media in acclimatization of rooted in vitro shootlets to outside conditions.

Keywords: *M* x *M* Clones, MaxMa 14, rootstock, in vitro propagation.

GİRİŞ

Meyve ağaçları generatif ve vegetatif metotlarla çoğaltılmaktadırlar. Ancak meyve türlerinin çoğunda yabancı döllenmenin olması, bunların heterozigot yapıya sahip olmalarına neden olmaktadır. Bunun sonucunda da generatif yöntem olan tohum ile üretimle elde edilen bitkiler, tamamen ana bitki karakterinde olmayıp, istenilen özellikleri genellikle taşımamaktadırlar. Bu nedenle, meyve ağaçlarının vegetatif

yöntemlerle çoğaltılması gereklidir. Bu yöntemler içinde de en çok kullanılanlar, aşı ve çelik ile çoğaltmadır. Aşı ile çoğaltma durumunda anaç sorunu gündeme gelmektedir. Anaçlar, çöğür (generatif) ve klon (vegetatif) olmak üzere iki grupta toplanırlar. Çöğür anaçları, genetik varyasyonlar nedeniyle, üzerlerine aşılana çeşitlerin farklı verim ve gelişme göstermelerine, aşı uyuşması ile ilgili sorunların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu nedenle bir örnek gelişme ve verimliliği sağlayan, üzerlerine aşılana çeşitlerin farklı iklim ve toprak koşullarına uyum gösteren klon anaçlarının kullanılması gereklidir (Köksal, 1979).

Birçok ülkede meyveciliği geliştirmek, kaliteyi arttırmak amacı ile ıslah çalışmaları sonucunda, çeşitli özellikleri yönünden üstünlükleri olan klon anaçları elde edilmiştir. Meyveciliği gelişmiş olan ülkeler, uzun yıllardan beri değişik toprak, iklim şartlarına uygun olan, topraktan ve havadan bulaşabilen hastalık ve zararlılara dayanıklı, kolay çoğaltılabilen, sık dikime uygun, meyve bahçesinin kurulmasının ikinci yılından itibaren bol ve kaliteli ürün veren, budama, hasat, ilaçlama gibi kültürel işlemlerin kolaylıkla yapılmasına olanak sağlayan, bodur klonal anaçlarla fidan üretimi yapmaktadırlar.

Son yıllarda, kiraz için anaç çeşitliliğini arttırabilmek amacıyla, tür içi melezlemeler ve seleksiyon çalışmaları oldukça yoğunlaşmıştır. Söz konusu hibrit klon anaçları arasında, Colt, Cob - Cornflower, Camil (GM 79), Damil (GM 61/1), Inmil (GM 9), VP - 1 (Orlovski 28768), 1P - C1 (77 - 18/1A), Gisela klonları, HL 4, 6, 50, 84, GM 8/2834, GM 156, M x M (MaxMa) klonları, Pkv, *P. canescens*, *P. dropmoreana* bulunmaktadır (Iezzoni ve ark., 1991).

Klon anaçlarının kitlesel çoğaltımı çelik ve daldırma gibi metotlarla yapılmaktadır. Ancak, çoğaltma sırasında meydana gelen abiyotik veya biyotik sorunlar nedeniyle kayıplar büyük boyutlara ulaşabilmektedir. Ayrıca, mevsime bağlı olması ve yeterli sayıda anaçlık bitkinin bulunmaması da yine klasik vegetatif üretim yöntemlerinin kullanımını sınırlayan faktörler arasında yer almaktadır. Doku kültürü ile çoğaltma sayesinde, mevsime bağlı olmaksızın, hızlı olarak dar alanda kısa sürede fazla sayıda anaç elde etmek mümkün olmaktadır.

Bugüne kadar kiraz ile vişne çeşit ve anaçlarının mikro çoğaltımı üzerinde yapılmış çalışmalar mevcuttur. Skirvin (1984), sert çekirdekli türlere ait doku kültürü çalışmalarını derlediği makalesinde, kiraz ve vişne genellikle MS besin ortamının makro ve mikro elementlerinin kullanıldığını, ancak bazı araştırmacıların, modifiye ettikleri MS ortamlarından da yararlandıklarını belirtmektedir. Modifiye işlemlerinden birisi, sararma belirtisine karşı besin ortamında demir miktarının artırılmasıdır. Vitamin olarak, 10 değişik vitamin karışımı (Skirvin ve Chu, 1979), Linsmaier Skoog vitaminleri ve MS vitaminleri, besin ortamı içinde yer almaktadır.

Enerji kaynağı olarak, 20-30 g l⁻¹ konsantrasyonda sakkaroz kullanılmakta, bazı ekstrem durumlarda ise daha yüksek konsantrasyonda da kullanılmaktadır (Borkowska ve Szczerba, 1991; Morini ve ark., 1992). *Prunus* türlerinde katı ortam, sıvı ortama göre daha fazla tercih edilmekte olup, 6-8 g l⁻¹ agar ilavesi yapılmaktadır. Kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri ile konsantrasyonları kültür aşamasına ve bitki türüne göre farklılık göstermektedir.

In vitro çoğaltılmada çeşitli sorunları olan Mazzard anacı üzerinde çalışan Sauer (1985), genç sürgünlerin tepe tomurcuklarının meristemini 0,1 mg l⁻¹ NAA ve 2 mg l⁻¹ BAP içeren MS ortamında kültüre alarak, yan sürgünlerin gelişmesini sağlamıştır. Kültürler, 25 ± 1°C'de 16 h ışık-8 h karanlık periyotta ve 900 lux ışıkta tutulmuşlardır. Sürgünler, 1/3 oranında seyreltilmiş, 2 mg l⁻¹ IAA içeren katı veya sıvı MS besin ortamında köklendirilmişlerdir. Köklendirme aşaması da aynı sıcaklık ve fotoperiyotta gerçekleşmiş, ancak ışık intensitesi 500-600 lux'e düşürülmüştür. F 12/1 (*Prunus avium*), Colt (*P. avium* x *P. pseudocerasus*) kiraz anaçlarını sürgün ucu ile üretmeye çalışan Hammannt and Grant (1993), besin ortamının pH'sının 5,0'a düşürülmesi, BA konsantrasyonunun 2.2 µM, agar konsantrasyonunun 5,5 veya 6,5 g l⁻¹ olması ve besin ortamına 1,0 µM floroglisinol ilave edilmesi durumunda sürgün çoğalmasının arttığını tespit etmişlerdir.

Duston (1981), F 12/1 (*P. avium*) anacının 8 µM NAA içeren ortamda köklendiğini saptamıştır. Ancak, bu sürgünler kallus oluşturmuşlar, meydana gelen kökler birbirlerine yapışmışlar ve daha ince olmuşlardır. Ayrıca, bu şekilde köklenen sürgünler, toprağa transfer edildikleri zaman ölmüşlerdir. 4,0 µM gibi daha düşük NAA ve 4,96 µM BA içeren MS besin ortamında ise, *in vitro* sürgünlerin köklenmesinin daha iyi olduğu gözlenmiştir. Riffaud and Cornu (1981), *Prunus avium* sürgünlerinin köklenmesinde, sürgünlerin dikimden önce 5,0 µM IBA'ya batırma ile 5,0 µM IBA içeren besin ortamına dikim arasında herhangi bir farklılık olmadığını tespit etmişlerdir. Vegetatif olarak zor üretilen, bir kiraz anacı olan Mazzard'ın *in vitro* üretilmesi üzerinde çalışan Ranjit and Kester (1988), 50-100 mm büyüklüğündeki bitkisel materyali, Tween 20 ilave edilmiş olan % 20'lik klorakta sterilize etmişlerdir. Çalışmada, besin ortamı olarak modifiye edilmiş MS ortamı kullanılmış, 6,0 g l⁻¹ agar ilave edilerek pH 5,7'ye ayarlanmıştır. Bu çalışmada esas olarak zor köklenen Mazzard anacının, kolay köklenen Colt anacı ile birlikte dikilmesi durumunda köklenme durumunda değişiklik olup, olmayacağı saptanmaya çalışılmıştır ve Colt ile birlikte kültüre alınması durumunda Mazzard anacının köklenme ve gelişme gücünün arttığı saptanmıştır. Çalışmadan elde edilen bir diğer bulgu da GA₃'ün köklenme üzerine olumsuz etkide bulunduğu, ancak sürgünlerin kuvveti üzerine olumlu etki yaparak, uzamayı ve gelişmeyi arttırmasıdır. F 12/1 kiraz anacının sürgün ucu ile çoğaltılması üzerinde çalışan Goudarzi ve ark., (1997), eksplantların çoğalması aşamasında besin ortamı olarak, NAA ve BA bulunan MS

besin ortamının tuzları ile LS besin ortamının vitaminlerini içeren bir ortam kullanmışlardır. Uzama aşamasında en iyi sonuç, 0.25 mg l⁻¹ NAA ile 1 mg l⁻¹ BA bulunan ortamında elde edilirken, in vitro bitkiciklerin köklenmesi, 1 mg l⁻¹ IBA içeren modifiye edilmiş LS besin ortamında gerçekleşmiştir. Araştırmada köklü in vitro bitkicikler bir ay süre ile hormon içermeyen MS besin ortamında geliştirildikten sonra, saksılara aktarılmıştır.

Bu çalışmada, *P. mahaleb* x *P. avium* melezi olan M x M klonlarından olan MaxMa 14 kiraz anacının sürgün uçlarından yararlanarak *in vitro* çoğaltma olanaklarının araştırılması ve geliştirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Araştırmada, kiraz klon anaçlarından, *P. mahaleb* x *P. avium* melezlemesi sonucunda elde edilen M x M klonlarından MaxMa 14 kullanılmıştır.

Çalışmada MS (Murashige-Skoog, 1962) besin ortamı gelişme, çoğalma ve köklenme üzere değişik aşamalarda, farklı hormon çeşidi ve konsantrasyonlarıyla denenmiştir. Hormon olarak, oksin grubundan, indol butirik asit (IBA) ve naftalen asetik asit (NAA); gibberellin grubundan gibberellik asit (GA₃), sitokinin grubundan da benzil adenin (BA) kullanılmıştır. Besin ortamlarına 30 g l⁻¹ sakkaroz ve 7 g l⁻¹ agar ilave edilmiştir. Besin ortamlarının pH değerleri, pH-metre yardımı ile NaOH ve HCl kullanılarak 5,3'e ayarlanmıştır.

Denemede çoğalma ve gelişme amacı ile kullanılan MS besin ortamlarının hormon içerikleri ve bu ortamlara verilen numaralar aşağıda yer almaktadır.

1. MS + 1 mg l⁻¹ BA + 0,1 mg l⁻¹ IBA
2. MS + 1 mg l⁻¹ BA + 0,1 mg l⁻¹ NAA
3. MS + 1 mg l⁻¹ BA + 0,1 mg l⁻¹ IBA + 0,1 mg l⁻¹ GA₃
4. MS + 1 mg l⁻¹ BA + 0,1 mg l⁻¹ NAA + 0,1 mg l⁻¹ GA₃
5. MS + 1 mg l⁻¹ BA + 0,25 mg l⁻¹ IBA
6. MS + 1 mg l⁻¹ BA + 0,5 mg l⁻¹ IBA
7. MS + 1 mg l⁻¹ BA + 0,25 mg l⁻¹ NAA
8. MS + 1 mg l⁻¹ BA + 0,5 mg l⁻¹ NAA
9. MS + 1 mg l⁻¹ BA + 0,25 mg l⁻¹ IBA + 0,1 mg l⁻¹ GA₃
10. MS + 1 mg l⁻¹ BA + 0,5 mg l⁻¹ IBA + 0,1 mg l⁻¹ GA₃
11. MS + 1 mg l⁻¹ BA + 0,1 mg l⁻¹ IBA + 0,25 mg l⁻¹ GA₃
12. MS + 1 mg l⁻¹ BA + 0,25 mg l⁻¹ IBA + 0,25 mg l⁻¹ GA₃
13. MS + 1 mg l⁻¹ BA + 0,5 mg l⁻¹ IBA + 0,25 mg l⁻¹ GA₃
14. MS + 1 mg l⁻¹ BA + 0,25 mg l⁻¹ NAA + 0,1 mg l⁻¹ GA₃

15. MS + 1 mg l⁻¹ BA + 0,5 mg l⁻¹ NAA + 0,1 mg l⁻¹ GA₃
16. MS + 1 mg l⁻¹ BA + 0,1 mg l⁻¹ NAA + 0,25 mg l⁻¹ GA₃
17. MS + 1 mg l⁻¹ BA + 0,25 mg l⁻¹ NAA + 0,25 mg l⁻¹ GA₃
18. MS + 1 mg l⁻¹ BA + 0,5 mg l⁻¹ NAA + 0,25 mg l⁻¹ GA₃

Elde edilen *in vitro* bitkiciklerin köklendirilmesi amacıyla 0, 4 ve 8 µM konsantrasyonda NAA ve IBA bulunan ve 2 g l⁻¹ aktif kömür ilave edilerek hazırlanarak 1/2 oranında seyreltilen MS besin ortamları kullanılmıştır. *In vitro* bitkiciklerin besin ortamlarına dikimleri sırasında iki metot uygulanmıştır. Bunlardan birincisi, bitkiciğin dip kısmı kesilerek, yara yeri tazelenmiş ve köklendirme ortamlarına dikilmesi şeklindedir. İkincisi ise, dip kısmının kesilmesini takiben, 1 saniye süre ile 666 mg l⁻¹ konsantrasyondaki NAA çözeltisine batırıldıktan sonra, köklendirme ortamlarına dikimdir.

Steril saf su ile hazırlanan besin ortamları, daha önce steril hale getirilen tüp veya kavanozlara konulduktan sonra, 121 °C'de 1,2 atmosfer basınçtaki otoklavda 20 dakika tutularak sterilizasyonu yapılmıştır.

MaxMa 14 anacına ait sürgün uçları, bitkide vegetatif gelişmenin devam ettiği süre içinde alınmıştır. Alınan örnekler laboratuvara getirildikten sonra, boyları kısaltılıp, küçük yaprakların bir kısmı uzaklaştırılarak, tek tek çeşme suyu ile yıkanarak, materyal üzerindeki kaba kir uzaklaştırılmış, daha sonra sabunlu suya konulmuştur. Sabunlu suda ara sıra karıştırılarak 20 dakika bekletildikten sonra, akan çeşme suyu altında yine 20 dakika kadar yıkanarak ön sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Daha sonra steril kabinde, bir iki damla Tween 20 ilave edilen % 4 sodyum hipoklorit içeren, 1/2 oranında seyreltilmiş çamaşır suyunda 20 dakika tutularak örneklerin sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sodyum hipoklorit içeren sudan çıkarılan örnekler, üç kez beşer dakika süre ile steril saf suda tutularak dikime hazır duruma getirilmiştir (Muriithi, ve ark., 1982; Ranjit ve Kester, 1988).

In vitro koşullarda köklendirme aşamasından sonra, köklü *in vitro* sürgünler kültür kaplarından çıkarılarak, köklerdeki agarlar önce elle temizlenmiş, kalanlar ise akan su altında hiç agar kalmayınca kadar yıkanmışlardır. Daha sonra herhangi bir fungal bulaşmayı önlemek için Pomarsol çözeltisi kullanılmıştır. Bu işlemden sonra, daha önce steril hale getirilmiş alıştırma materyalleri (curuf, perlit, torf ve eşit oranda karıştırılan kum, bahçe toprağı ile gübre karışımından oluşan harç) ile doldurulan küçük plastik kaplara dikilerek sulama yapılmıştır. Dikim işleminden sonra, ortamdaki nemi koruyabilmek amacı ile kapların üzerleri plastik örtü ile örtülmüştür.

Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre üç tekerrürlü olarak yürütülmüş ve ortalamaların karşılaştırılmasında LSD testi kullanılmıştır. Yüzde

olarak hesaplanan kriterlerde açılı transformasyonu uygulanmış ve buna ait LSD değerleri verilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Sürgün ucu metodu ile *in vitro* çoğaltma amacıyla alınan sürgün uçlarının sterilizasyonu yapıldıktan sonra, materyal ve metod bölümünde içerikleri verilen 1 – 4 no'lu MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültüre alınan besin ortamlarında eksplantların canlılık oranları ortalama % 42,92 olup, ortamlara göre, % 38,33 (2 no'lu) ile 48,33 (4 no'lu) arasında değişmiştir. 1 no'lu ortamda % 41,67; 3 no'lu ortamda ise, % 43,33 oranında canlılık gerçekleşmiştir. Besin ortamlarında 0,1 mg l⁻¹ GA₃ bulunması canlılık oranının artmasını sağlamıştır. Başlangıçta kullanılan dört besin ortamında sağlanan canlılık açısından, ortamlar arasındaki farklılık önemlidir (LSD_{0,05} = 0,034).

IBA, NAA ve GA₃'ün değişik konsantrasyonlarının denenmesi, oksin olarak IBA veya NAA ve GA₃'ün etkilerinin ortaya konulabilmesi için ihtiyaç duyulan sayıda eksplanta, söz konusu dört besin ortamındaki çoğaltma ile ulaşıldıktan sonra, 18 farklı hormon içeriğindeki MS besin ortamlarındaki çoğalma ve sürgün gelişimi durumu belirlenmiştir.

Bir bitkiden meydana gelen sürgün sayısı besin ortamlarına bağlı olarak 0,0 ile 4,0 arasında değişmiş, ortalama olarak bir bitkiden 2,16 adet meydana gelmiştir. 2, 1, 3 ve 4 no'lu besin ortamlarında daha yüksek bir çoğalma meydana gelmiştir. Bu ortamlar 1 mg l⁻¹ BA + 0,1 mg l⁻¹ IBA / NAA içeren MS ortamları olup, 0,1 mg l⁻¹ GA₃ ilave edilmesi çoğalmanın çok az azalmasına neden olmakla birlikte bu 4 ortam arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır. Yine oksin olarak IBA veya NAA kullanılması durumunda da farklılık meydana gelmemiştir (Çizelge 1).

Genel olarak GA₃ konsantrasyonunun 0,25 mg l⁻¹ e yükseltilmesi eksplantlarda ölümlere neden olmuştur. 0,25 mg l⁻¹ GA₃ ile birlikte, oksin konsantrasyonunun da 0,5 mg l⁻¹ olması durumunda eksplantların tamamında ölümler meydana gelmiştir. En yüksek GA₃ konsantrasyonunun (0,25 mg l⁻¹) yanında oksin grubundan IBA veya NAA konsantrasyonunun biraz azaltılması (0,1 mg l⁻¹) durumunda ise, eksplantların bir kısmında ölümler meydana gelmekle birlikte canlı kalanlar da olmuştur. Ancak, canlılığı sürdüren eksplantlarda her hangi bir çoğalma meydana gelmemiştir. Buradan, kullanılacak hormonların sadece konsantrasyonlarının değil, ortam içinde bulunan diğer hormon konsantrasyonlarıyla olan oranının önemli olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır.

Çizelge 1. MaxMa 14 anacının 18 farklı besin ortamındaki çoğalma oranı (adet/eksplant).
Table 1. Multiplication ratio of MaxMa 14 rootstock at 18 different culture media (#/explant).

Ortam no # Media	Çoğalma Multiplication	Ortam No # Media	Çoğalma Multiplication
1	3,8	10	2,6
2	4,0	11	0,8
3	3,6	12	0,4
4	3,6	13	0,0
5	3,2	14	2,4
6	2,6	15	2,2
7	3,0	16	0,6
8	2,6	17	0,6
9	2,8	18	0,0
Ortalama (Average)		2,16	
LSD _{0,05}		0,552*	

Çalışmada, çoğalma üzerine besin ortamlarının etkisinin belirlenmesi yanı sıra, çoğalan bitkiciklerin gelişmeleri de incelenmiştir. Bu amaçla, her bir bitkiden meydana gelen yeni bitkicikler boylarına göre küçük (< 1cm), orta (1 – 2,5 cm) ve büyük (> 2,5 cm) olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Kültüre alınıştan beş hafta sonra meydana gelen yeni bitkiciklerin boyları incelendiğinde, farklı hormon içeriğine sahip besin ortamlarında meydana gelen sürgün sayıları açısından istatistiksel olarak bir farklılık olmadığı saptanmıştır. Denenen tüm besin ortamlarında eksplant başına meydana gelen küçük (< 1cm) ve orta (1 – 2,5 cm) boy sürgün sayısı, büyük (> 2,5 cm) sürgün sayısından daha fazla olmuştur. 2,5 cm'den daha uzun sürgün, oldukça az sayıda meydana gelmiştir (Çizelge 2). Küçük ve orta büyüklükteki sürgünlerin sayısının daha fazla olması bazı ortamlarda, ölümlerin meydana gelmesinin yanında, bazı besin ortamlarında da çoğalmanın gerçekleşmeyip, dikilen eksplantın sadece bir miktar uzamasından ileri gelmektedir.

Çizelge 2. Farklı besin ortamlarında bir eksplanttan oluşan sürgünlerin boylarına göre gruplandırılması.

Table 2. Classification according to length of shootlet excised from explant on the different culture media.

Ortam no # Media	Sürgün sayısı (adet/eksplant) # Shoot (# / Explant)		
	(< 1 cm)	(1 – 2,5 cm)	(> 2,5 cm)
1	1	2	1
2	1	2	1
3	1	1	1
4	1	2	1
5	1	2	0
6	1	1	1
7	1	2	0
8	1	1	0
9	1	1	0
10	1	1	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	1	1	1
15	1	1	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
LSD _{0,05}	Ö.d.	ö.d.	ö.d.

Elde edilen *in vitro* bitkiciklerin, köklendirme çalışmalarında 0, 4 ve 8 μM konsantrasyonda NAA veya IBA bulunan ve 2 g l⁻¹ aktif kömür ilave edilerek hazırlanarak 1/2 oranında seyreltilmiş MS besin ortamları kullanılmıştır. Fridborg and Eriksson (1975), monokotiledon bitkilerin, Eliasson (1981) dikotiledon bitkilerin ve Patel and Thorpe (1984) conifera familyasına ait bitkilerin *in vitro* üretilmeleri sırasında ortama aktif kömürün eklenmesi durumunda köklenmenin arttığını belirtmektedirler. Daha önce diğer bazı kiraz klon anaçlarına ait *in vitro* bitkilerin köklendirilmesi ile ilgili yapılan ön çalışmalarda aynı içerikteki besin ortamlarına aktif kömür ilave edilmemesi durumunda köklenmenin çok düşük olduğu veya hiç olmadığı gözlemlendiği için, ortamlara aktif kömür konulmuştur. *In vitro* bitkiciklerin bir kısmı, köklendirme ortamına dikilmeden önce, dip kısımları 666 mg l⁻¹ NAA çözeltisine 1 saniye süre ile batırılmışlardır.

Köklendirme çalışmasının yapıldığı beş farklı içerikteki besin ortamları arasında istatistiki olarak farklılık bulunmamıştır (Çizelge 3). Bitkiciklere yapılan NAA uygulaması dikkate alınmadan ortamlardaki köklenme oranları % 41,67 ile % 54,16 arasında değişmiştir. En yüksek köklenme oranı 4 µM IBA bulunan besin ortamında gerçekleşirken, en düşük köklenme de hormon içermeyen ve 8 µM IBA/NAA içeren ortamlardaki bitkiciklerde meydana gelmiştir. Ancak, oksin olarak kullanılan NAA ve IBA'nın etkileri bakımından her hangi bir fark tespit edilemediği gibi, denenen iki konsantrasyon arasında da her hangi bir farklılık olmamıştır. Bununla birlikte, elde edilen oranlara bakarak, 4 µM konsantrasyonun gerek kontrole göre, gerekse 8 µM'e göre daha iyi olduğu söylenebilir. Bu nedenle bazı araştırmacıların belirttiği gibi 5 µM IBA veya NAA konsantrasyonunun ileride yapılacak çalışmalarda denemesinde yarar vardır. Bazı araştırmacılar IBA ve NAA içeren *in vitro* köklenme ortamlarında köklenme açısından farklılık olmadığını saptarlarken (Jiangang ve Jishan, 1994; Aksoy ve Hepaksoy, 2004), Paul ve Feucht (1985), bazı kiraz ile vişne türlerinin anaç ve çeşitlerinin *in vitro* köklenmesi üzerinde IBA'nın en etkili oksin olduğunu bildirmektedir. Bu çalışmada IBA ile NAA arasında belirgin bir farklılık saptanamamış olmakla birlikte IBA'nın biraz daha iyi olduğu söylenebilir.

Besin ortamlarına dikimden önce, *in vitro* bitkiciklerin 666 mg l⁻¹ NAA çözeltisi ile muamele edilmesi, köklenen bitki sayısının artmasına neden olmuştur. NAA uygulaması yapılmadan dikilen bitkiciklerin ortalama olarak % 36,66'sı köklenirken, NAA uygulaması yapılan bitkiciklerin % 55,00'i köklenmiştir. NAA uygulamasının köklenme oranını arttırması tüm besin ortamlarında gerçekleşmiştir. Bu nedenle dikim öncesi hormon uygulamasının köklenme üzerine yararlı olduğunu rahatlıkla söylenebilir. Riffaud ve Cornu (1981), *Prunus avium* sürgünlerinin köklenmesinde, sürgünlerin dikimden önce 5,0 µM IBA'ya batırma ile 5,0 µM IBA içeren besin ortamına dikim arasında herhangi bir farklılık olmadığını belirtmiştir. Ancak, besin ortamlarına konulan miktarlarda değil de, çok daha yüksek konsantrasyonlarda uygulamaların olumlu sonuç verdiği dair sonuçlar bulunmaktadır. Bu konuda IBA uygulamalarının başarılı olduğuna dair bazı çalışmalar mevcuttur (Smith ve Thorpe, 1975; Phillion ve ark., 1983). Ancak köklenmeyi teşvik edici diğer hormonların da denemesinde yarar vardır. Hormon tipi yanı sıra, konsantrasyon üzerinde de çalışmalar yapılmalıdır. Ancak konsantrasyonların denemesi sırasında, bitkiciklerin küçük ve çok taze oldukları göz ardı edilmemelidir. Aksi takdirde çok yüksek konsantrasyondaki hormon çözeltileriyle muamele bitkilerin ölümlerine neden olabilir.

Çizelge 3. *In vitro* sürgünlerin 2 g l⁻¹ aktif kömür eklenmiş 5 farklı MS besin ortamındaki NAA uygulaması yapılması ve yapılmaması durumundaki köklenme oranları (%).

Table 3. Rooting ratio of *in vitro* shootlets dipped with or without NAA on the 5 different MS medium supplemented 2 g l⁻¹ active coal (%).

Hormon konsantrasyonu Hormone concentration (µM)	NAA uygulaması NAA application	Köklenme oranı Rooting ratio (%)
0 NAA / IBA	-	33,33
0 NAA / IBA	+	50,00
4 NAA	-	41,66
4 NAA	+	58,33
8 NAA	-	33,33
8 NAA	+	50,00
4 IBA	-	41,66
4 IBA	+	66,66
8 IBA	-	33,33
8 IBA	+	50,00
LSD _{0,05 ortam} ö.d.	LSD _{0,05 NAA uyg.} 0,096*	LSD _{0,05 ortam x NAA uyg.} ö.d.

- NAA uygulaması yapılmayan + NAA uygulaması yapılan

Doku kültürü ile üretimin en son ve en önemli aşaması, elde edilen köklü bitkiciklerin dış koşullara aktarmadır. *In vitro* koşullarda gelişen köklü bitkiciklerin yaklaşık % 100 oransal nem içeren ortamdan alınarak, yine oransal nemi yüksek olan yerlerde dış koşullara aktarılması alıştırma için gereklidir. Alıştırma sırasında köklü bitkicikler, değişik yetiştirme ortamlarına dikilebilirler.

Çalışmada köklenen *in vitro* bitkicikler, köklendirme ortamından çıkarılarak, gelişimlerinin engellenmemesi için köklerindeki agar, akar su altında iyice yıkanarak, temizlenmiştir. Daha sonra, her hangi bir fungal bulaşmayı engellemek amacıyla, bitkicikler bakırlı preparat olan Pomarsol eriyiği ile muamele edilerek, önceden sterilize edilmiş olan değişik ortamlarla doldurulan küçük plastik kaplara şaşırtılmışlardır. Sulama yapıldıktan sonra, nemin korunabilmesi için üzerleri naylon örtü ile kapatılmıştır. Bitkicikler, bir süre büyüdükten sonra, üzerleri gün içinde kademeli olarak açılarak, dış ortama alışmaları sağlanmış, daha sonra da tamamen açılmıştır.

Ortam olarak, curuf, perlit, torf ve eşit oranda karıştırılan kum, bahçe toprağı ile gübre karışımından oluşan harç kullanılmıştır. Alıştırma ortamlarına dikilen bitkiciklerin gelişme performanslarını ortaya koyabilmek için, tutum oranı, dikim öncesi ve dikimden 6 hafta sonraki kök ve sürgün uzunlukları ile yaprak sayıları belirlenerek, aradaki fark hesaplanmıştır. Böylece, bitkiciklerin ortamlardaki gelişme farklılığı net olarak ortaya konulmuştur. Ancak, bitkiciklerin kök sayıları belirlenmemiştir. Çünkü, söküm sırasında ve daha sonra yapılan yıkama işlemi sırasında köklerde kopma ve kırılmalar meydana gelmektedir.

Elde edilen *in vitro* köklü bitkiciklerin dış ortama aktarılması sırasında kullanılan ortamlarda tutum oranları % 40 ile % 60 arasında değişmiştir. Perlit ortamında en düşük tutum oranı gerçekleşmiş olup, bu ortam diğerlerinden istatistiksel olarak ayrılmıştır. Diğer ortamlar arasında farklılık olmamakla birlikte, curuf ve torf ortamına dikilen bitkilerde daha yüksek oranda tutum olmuştur (Çizelge 4).

Çizelge 4. Köklü bitkiciklerin farklı alıştırma ortamlarındaki (%) tutum oranları.
Table 4. Stand ratio of rooted *in vitro* shootlets on the different acclimatization medium (%).

Ortam (Media)	Tutum oranı (Stand ratio) (%)
Curuf (Volcanic tuff)	60,00
Harç (Mixture)	53,33
Perlit (Perite)	40,00
Torf (Peat)	60,00
Ortalama (Average)	53,33
LSD _{0.05}	0,109*

Köklü bitkilerin alıştırma ortamlarına dikimlerinden sonra, 6 haftalık süre içindeki gelişmeleri incelendiği zaman, en fazla kök gelişiminin torf, daha sonra perlit ortamında gerçekleştiği görülmektedir. Bu iki ortamı curuf ve harç izlemektedir (Çizelge 5). Ortalama kök uzunluğu açısından tüm ortamlar birbirinden farklı olurken, ortalama sürgün uzunluğu açısından, torf ve harçta aynı oranda gelişme sağlanmıştır. Benzer şekilde curuf ve perlit ortamlarındaki bitkiler birbirlerine çok yakın gelişme göstermişlerdir. Bitkilerde 6 hafta sonunda meydana gelen yeni yapraklar açısından alıştırma ortamlarının etkisi ise biraz daha farklı olmuştur. En fazla yaprak oluşumu torf ve harç ortamlarında gerçekleşmiş, bu iki ortam aynı grupta yer almıştır. Üçüncü sırada yer alan curuf ortamında yetişen bitkilerin yaprak sayısı bakımından harç ortamında yetişenlere benzer olmuştur. En az sayıda yeni yaprak perlit ortamında yetişen bitkilerde meydana gelmiştir.

Çizelge 5. *In vitro* köklü bitkiciklerin farklı alıştırma ortamlarında 6 haftalık net gelişme durumları.

Table 5. Net growing of rooded *in vitro* plantlets on the different acclimatization medium in 6 weeks after planting.

Ortam Medium	Ortalama kök uzunluğu Average length of root (mm)	Ortalama sürgün uzunluğu Average length of shoot (mm)	Ortalama yaprak sayısı (adet) Average leaf number (#)
Curuf (Volcanic tuff)	40,67	47,67	1,67
Harç (Mixture)	22,33	64,67	2,33
Perlit (Perite)	48,00	47,33	1,33
Torf (Peat)	54,33	68,67	3,00
Ortalama Average	41,33	57,09	2,08
LSD _{0,05}	5,070*	7,190*	0,941*

Bitkilerin gelişmeleri genel olarak değerlendirildiğinde, torf ve harcın diğer iki ortama göre daha iyi bir gelişim sağladığı söylenebilir. Ancak, harç ortamında bitkiciklerin tutum oranı daha düşük olmuştur. Eşit oranda karıştırılan kum, bahçe toprağı ve gübre karışımından oluşan harç materyali, bitkinin köklerinin gelişebilmesi için torfa göre daha sıkışık, ağır bir ortam oluşturduğu için, başlangıçta tutum sırasında sorunlar ortaya çıkmakla beraber, tutumun gerçekleşmesinden sonra, içinde bulunan besin maddeleri nedeni ile özellikle sürgün gelişmesi ve buna bağlı olarak yaprak oluşumu üzerine olumlu etkide bulunabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle karışım oranlarının değiştirilmesi veya karışıma torf, perlit gibi materyallerin de ilave edilmesinde yarar olabilir.

SONUÇ

MaxMa 14 kiraz anacının sürgün ucu ile çoğaltılma olanakların belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada çoğalma ve gelişmeyi sağlayabilmek amacıyla 1 mg l⁻¹ BA sabit tutularak oksin olarak IBA veya NAA ile bunların konsantrasyonlarının (0,1; 0,25 ve 0,5 mg l⁻¹) etkisi araştırılmıştır. Ayrıca ortama GA₃ eklenmesinin etkisinin olup, olmadığı, varsa hangi konsantrasyonda besin ortamında bulunması gerektiği belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, gelişme ve çoğalma üzerine GA₃'ün olumlu etkisinin bulunmadığı, özellikle yüksek konsantrasyonda olumsuz yönde etkili olduğu saptanmıştır. Oksin olarak kullanılan IBA ve NAA arasında bir farklılık olmadığı, benziladenin ile birlikte 0,1 mg l⁻¹ ortama eklenmesi durumunda en yüksek çoğalmanın sağlandığı tespit edilmiştir. Köklenme ortamına 4 veya 8 µM IBA/NAA eklenmesi köklenmeyi arttırmakla birlikte çok tatminkar değildir.

Köklenmesinin artırılabilmesi için, besin ortamlarına dikilmeden önce *in vitro* bitkiciklerin oksin çözeltisine batırılmaları yararlıdır. Bu çalışma sonucunda 666 mg l^{-1} NAA çözeltisi olumlu sonuç vermiştir. Ancak, bu uygulamaya rağmen, köklenme % 66,66'ya çıkarılabilmektedir. Bu nedenle diğer oksinler farklı konsantrasyonlarda denenmelidir. Köklenmeyi arttırmak amacıyla, köklendirme ortam denemelerinin de yapılmasında yarar vardır. Ayrıca, alıştırma ortamı denemelerinin de yapılması, bu aşamadaki bitki kayıplarının azaltılması gereklidir. Çünkü, bu çalışma sonucunda elde edilen en yüksek köklenme ile bile bitkilerde köklenme aşamasında % 35'lik kayıp meydana gelmektedir. Alıştırma aşamasında da en az kayıp % 40 olmuştur. Bu da göz önüne alındığında, elde edilen *in vitro* bitkilerin yaklaşık olarak % 40'ı anaç olarak değerlendirilebilecektir ki, bu yüksek bir değer değildir.

LİTERATÜR LİSTESİ

- Aksoy, U. ve S. Hepaksoy. 2004. Seçilmiş üstün nitelikli Sarılop incir klonlarının çoğaltılması üzerinde araştırmalar. Ege Ü. Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü 2000 ZRF 016 no'lu Proje Sonuç Raporu. Bornova, İzmir.
- Borkowska, B., and J. Szczerba. 1991. Influence of different carbon sources on invertase activity and growth of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) shoot cultures. Journal of Experimental Botany 240 (42): 911-915.
- Dunston, A. I. 1981. Transplantation and post-transplantation of micropropagated tree-fruit rootstocks. Intern. Plant prop. Soc. Combined Proc., 31: 39-45.
- Goudarzi, R., A. Majedi, A. R. Talaie, and M. Mostafavi. 1997. Micropropagation of cherry rootstock (*Prunus avium* cv F12/1) by shoot tip culture. Iranian Journal of Agricultural Sciences, 28 (3): 133-143.
- Hammatt, N., and N. J. Grant. 1993. Apparent rejuvenation of mature wild cherry (*Prunus avium* L.) during micropagation. Journal of Plant Physiology. 141 (3): 341-346.
- Iezzoni, A., Schmidt, H. and Albertini, A., 1991. Cherries (*Prunus*). Acta Horticulturae, 290-III: 111-173.
- Jiangang, H. and Jishan, G., 1994. A study on tissue culture of *Ficus carica*. Journal of Nanjing Forestry University 18 (3): 73-76.

- Köksal, İ., 1979. Anaç ve Çeşit Arasındaki Etkileşmenin Meyve Yetiştiriciliğindeki Önemi. A.Ü.Z.F. Yayınları. No. 702, Derlemeler, 21. Ankara.
- Morini, S., Sciutti, and P. Fortuna. 1992. In vitro growth response of *Prunus cerasifera* shoots as influenced by different light-dark cycles and sucrose concentrations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28 (3): 245-248.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.*, 15: 473-497.
- Muriithi, L. M., T. S. Rangan, and B. H. Waite. 1982. *In vitro* propagation of fig through shoot tip culture. *HortScience*, 17 (1): 86-87.
- Paul, L. and W. Feucht. 1985. Rooting sweeting sweet and sour cherry cultivars and clones *in vitro*. *Mitteilungen Klosterneuburg. Rebe und wein*, 35 (2): 69-74.
- Phillion, B. J., J. deWitt, and W. R. Bunting. 1983. Propagation of juvenile scots pine cuttings under a 24-hour photoperiod. *Tree Planters' Notes*. 34: 39-42.
- Ranjit, M., and D. E. Kester. 1988. Micropropagation of cherry roktstocks. II. Invigoration and enhanced rooting of 46-1. Mazzard by co-culture with colt.. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113 (1): 150-154.
- Sauer, A. 1985. *In vitro* propagation of *Prunus avium* L. and storage of *in vitro* derived plantlets. *Acta Horticulturae*, 169: 351.
- Skirvin, R. M. 1984. Stone Fruits. (Handbook of plant Cell Culture, Vol. 3 Crop Species, Ed. by P. V. Ammirato, D. A. Evans, W. R. Sharp and Y. Yamado) Mc. Millan Publishing Comp. NewYork.
- Skirvin, R. M., and M. C. Chu. 1979. *In vitro* propagation of "Forever Yours" rose. *Hort. Science* 15(4): 608-610.
- Smith, D. R., and T. A. Thorpe. 1975. Root initiation in cuttings of *Pinus radiata* seedlings. II. Growth regulator interactions. *J. Exp. Bot.* 26: 193-202.